

HUMANI PAPILOMAVIRUS I PROMJENE VRATA MATERNICE

I. Sabol¹, N. Milutin Gašperov^{1,2}



ČOVJEK
(od stanice do organizma)

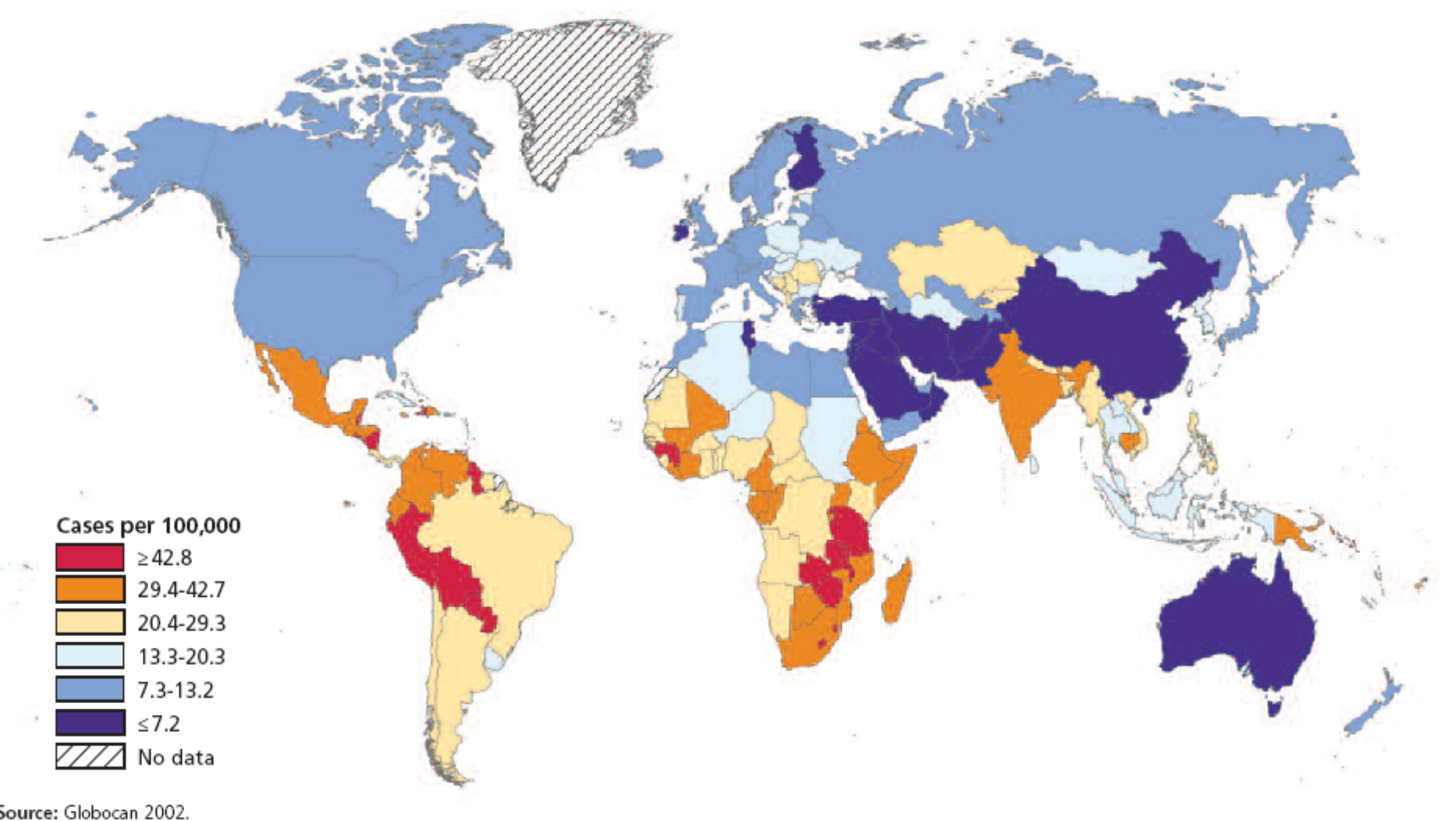
¹ Laboratorij za molekularnu virologiju i bakteriologiju, Zavod za molekularnu medicinu, Bijenička 54, 10000 Zagreb; ² Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Hebrangova 1, 10000 Zagreb

Rak vrata maternice

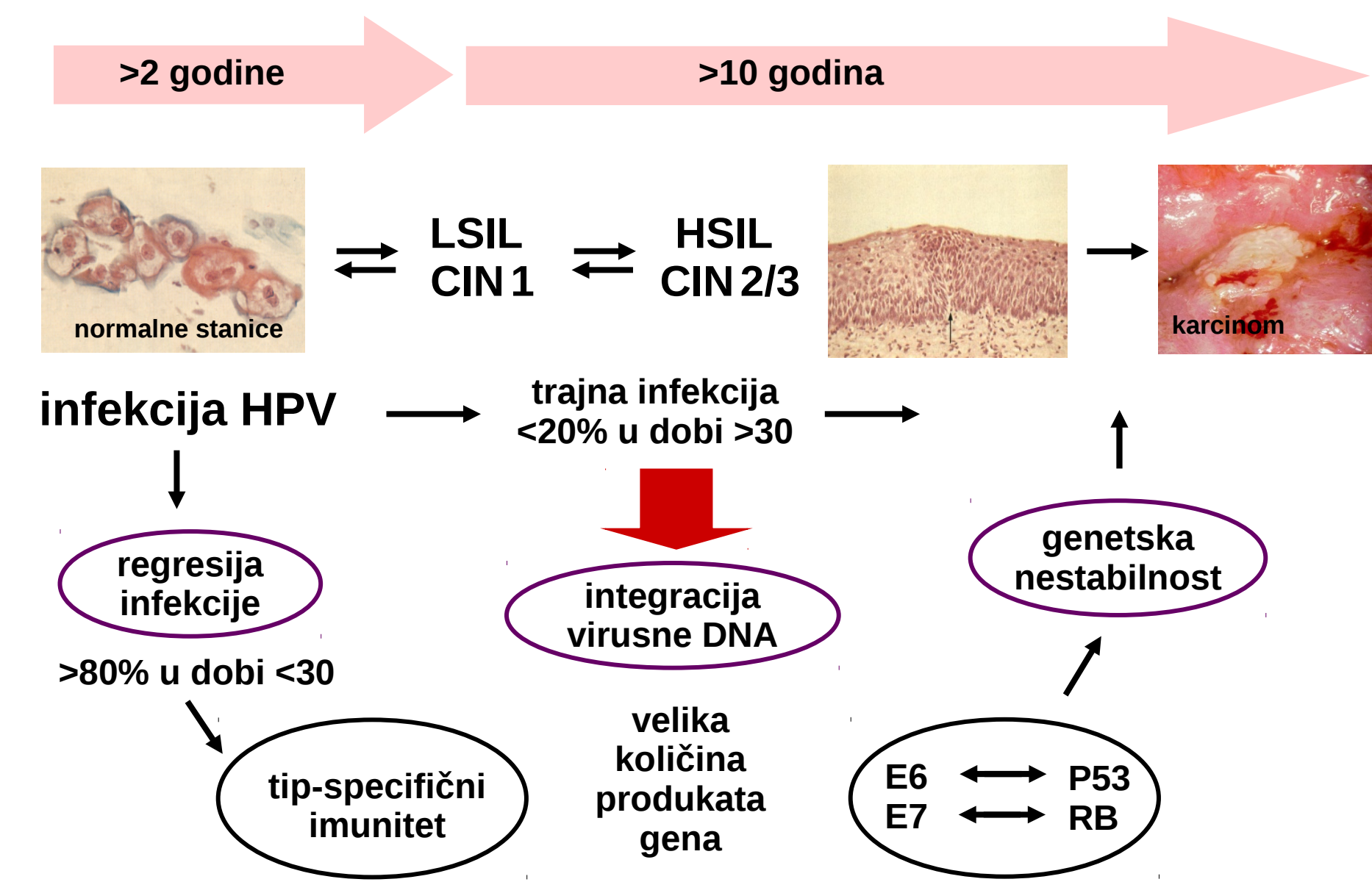
Glavni je preduvjet raka vrata maternice humani papiloma virus (HPV), a najjači utjecaj imaju 15 visokorizičnih tipova koji su značajno povezani s napredovanjem bolesti^{1,2}. Najučestaliji tipovi HPV-a u slučajevima raka vrata maternice u svijetu su 16 i 18. Poznate su geografske razlike u učestalosti tipova HPV-a, stoga je informativno odrediti najučestalije tipove u Hrvatskoj. Rak vrata maternice je drugi najučestaliji tip raka u svijetu sa preko 520.000 slučajeva i 274.000 smrti u svijetu (Slika 1)³. Ovaj tip raka je u Hrvatskoj na 7. mjestu po učestalosti sa 400 slučajeva i 150 smrti godišnje (podaci HZJZ).

Sama bolest se razvija dulji niz godina kroz sve opsežnije promjene pločastog epitela vrata maternice koje se citološki mogu dobro razlikovati. Citološki se promjene dijele na skvamozne intraepitelne lezije (SIL) niskog (L-SIL) i visokog stupnja (H-SIL), dok se histopatološki može razlikovati više stadija od blažih cervikalnih intraepitelnih neoplazija (CIN) stupnja 1, preko postupno težih, CIN 2 i 3, sve do invazivnog karcinoma (Slika 2). Promjene nastale virusom tako postupno napreduju prema sve težim, no čimbenici koji utječu na progresiju pojedine lezije nisu u potpunosti razjašnjeni.

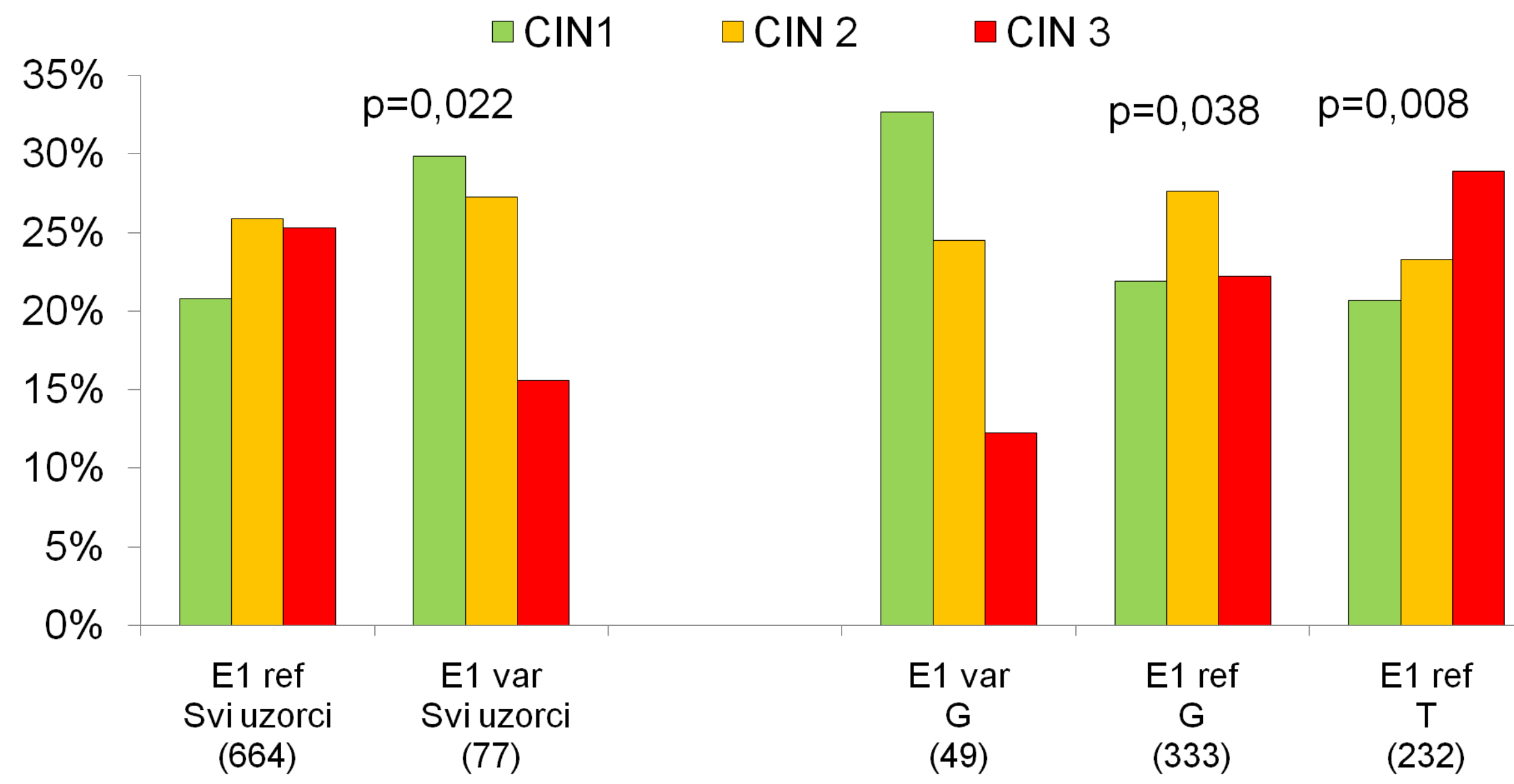
Slika 1. Dobno-standardizirana incidencija raka vrata maternice



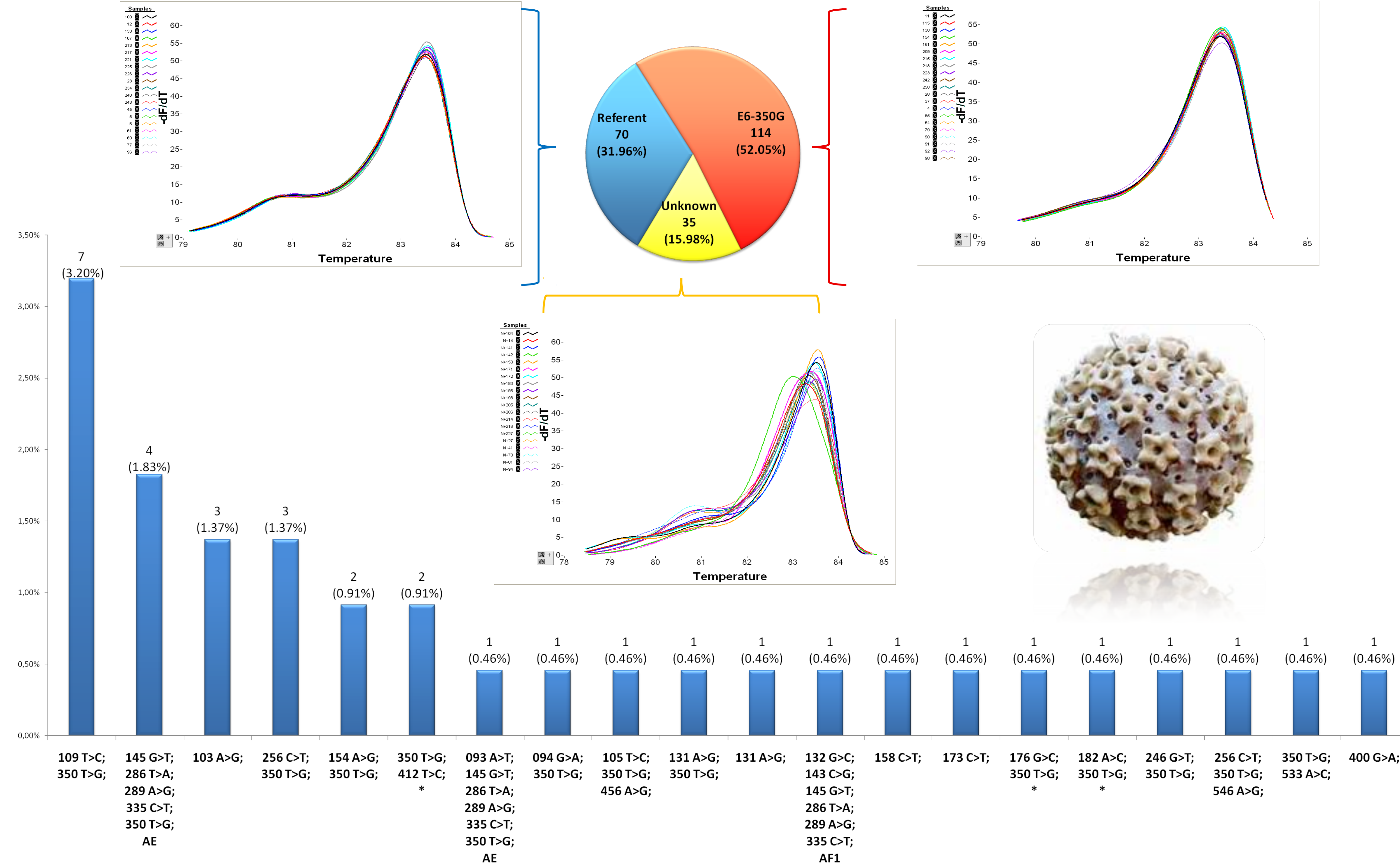
Slika 2. Karcinogeneza raka vrata maternice



Slika 6. Učestalost nove varijante HPV16 u promjenama vrata maternice različitih stupnjeva



Slika 5. Varijabilnost HPV 16 u Hrvatskoj



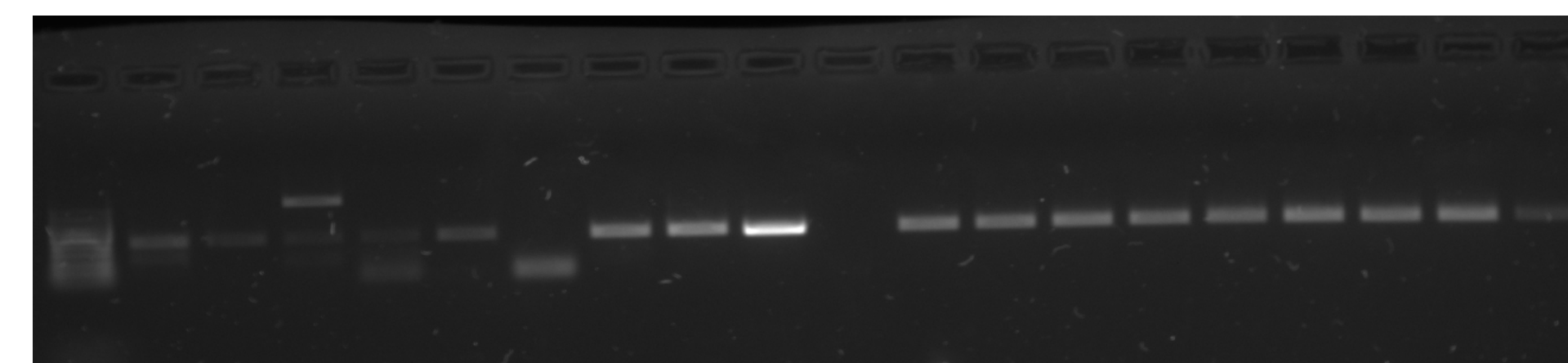
Epigenetske promjene

Na progresiju raka vrata maternice utječu mnogi čimbenici, međutim prisustvo virusa je ključan čimbenik. Činjenica je da samo mali broj promjena vrata maternice uzrokovanih visokorizičnim tipovima HPV-a napreduje sve do raka (Slika 2), a još nije u potpunosti jasno koji su točno čimbenici za to odgovorni. Zna se da tip virusa ima veliku ulogu^{4,5}, broj kopija virusa u zaraženim stanicama, fizičko stanje genoma virusa (episomalna forma ili ugrađena virusna DNA u genom stanice domaćina), istovremena infekcija s više tipova HPV-a, imunosupresija, ali i status metilacije virusnih i staničnih gena.

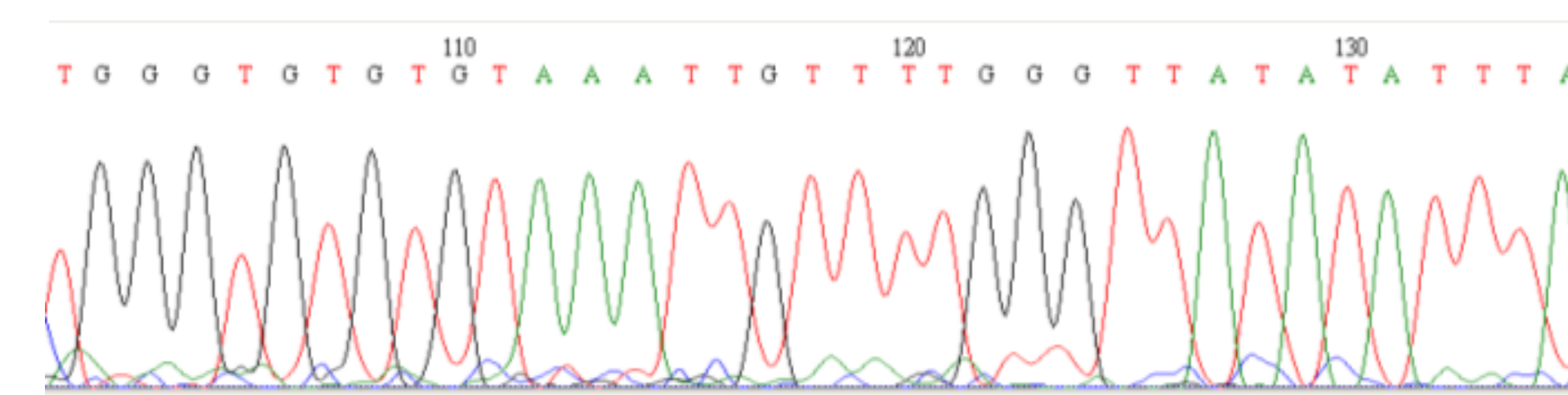
DNA-metilacija, glavna epigenetska promjena u sisavaca, je kovalentna modifikacija koja se najčešće javlja na CpG dinukleotidima. Metilacija citozina unutar promotora nekih tumorskih supresora vrlo je često povećana što dovodi do stišavanja funkcije tih gena i napredovanja tumora. Metilirani promotori mnogih gena su utvrđeni u samom raku vrata maternice, ali i u njegovim predstojima te su predmet opsežnih istraživanja budući da još nisu pronađeni najbolji biljezi koji bi se koristili u okviru primarnog populacijskog probira.⁸ Istovremeno se u organizmu događa i metilacija virusnog genoma, koja je najviše proučavana kod HPV tipova 16 i 18, budući da su najučestaliji i najvažniji pokretači maligne progresije.

U Hrvatskoj učestalost najzastupljenijih tipova HPV-a pada s porastom dobi ispitanika (Slika 4), dok učestalost rijetkih tipova HPV-a (HPV X) raste. DNA-sekvenciranjem smo naknadno utvrdili da su obiscima vrata maternice žena starijih od 55 godina neočekivano učestale infekcije tipom HPV 53, utvrđene u 10,3% te tipom HPV 66 utvrđene u 3,7% slučajeva. Istraživanja pokazuju da su HPV tipovi 53 i 66 relativno učestali u uzorcima žena s normalnim nalazom brisa vrata maternice, a ipak jako rijetko pronađeni u invazivnom karcinomu (<1%), tako da je njihova uloga u karcinogenezi još uvijek nerazjašnjena. Kako bismo pokušali razjasniti karcinogenost ovih tipova, analizirali smo stanje metilacije promotora različitih gena stanice domaćina. Za umnažanje DNA promotora staničnih gena, prethodno obrađene bisulfitom, u svrhu razlikovanja metilirane od nemetilirane, koristili smo metodu lančane reakcije polimerazom specifične za metilaciju (MSP, engl. *Methylation Specific* PCR; Slika 7A). Za određivanje metilacije virusnih gena koristili smo metodu određivanja slijeda nukleotida DNA, također prethodno obrađene bisulfitom, tzv. bisulfitno sekvenciranje (Slika 7B). Uočili smo da se metilacija promotora staničnih gena kod žena starijih od 55 godina, pozitivnih na HPV 53 i 66, znatno češće događa u odnosu na očekivane vrijednosti obzirom na dijagnozu (Tablica 1).

Slika 7. Određivanje stupnja metilacije DNA



A. Metoda MSP - uzorci vrata maternice umnoženi početnicama za metilirani (lijevo) i nemetilirani (desno) oblik gena *RARβ2*



B. Metoda bisulfitno sekvenciranje-nemetilirani CpG otok



C. Usporedba referentnog slijeda nukleotida HPV-a i proučavanog, konvertiranog bisulfitom-metilirani CpG otoci

Tablica 1. Metilacija promotora gena u različitim dijagnozama te u ispitnoj skupini žena starijih od 55 godina pozitivnih na HPV 53 i HPV 66

Promotori gena	Očekivane vrijednosti DNA metilacije ⁸			Metilacija
	LSIL	HSIL	Rak vrata maternice	
<i>CCNA1</i>	0%	36%	93%	29%
<i>CDH1</i>	7%	22%	47%	94%
<i>DAPK1</i>	6%	30%	52%	71%
<i>HIC1</i>	52%	70%	71%	72%
<i>RARβ2</i>	5%	15%	40%	78%

References

- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999;189(1):12-9.
- de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Grce M, Muñoz N, Bosch FX; Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. Lancet Oncol. 2010;11(11):1048-56.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
- Milutin-Gasperov N, Sabol I, Halec G, Matovina M, Grce M. Retrospective study of the prevalence of high-risk human papillomaviruses among Croatian women. Coll Antropol. 2007; 31(Suppl 2): 89-96.
- Milutin-Gasperov N, Sabol I, Matovina M, Spaventi S, Grce M. Detection and Typing of Human Papillomaviruses Combining Different Methods: Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism, Line Probe Assay and Sequencing. Pathol Oncol Res. 2008, 14(4): 355-363.
- Sabol I, Cretnik M, Hadzisejdic I, Si-Mohammed A, Matovina M, Grahovac B, Levant S, Grce M. A new approach for Human Papillomavirus Type 16 Variability Evaluation with High Resolution Melt Sequence Analysis. J Virol Meth 2009; 162(1-2):142-7.
- Sabol I, Matovina M, Milutin-Gasperov N, Grce M.* Identification of a novel Human papillomavirus type 16 E1 gene variant with potentially reduced oncogenicity. J Med Virol. 2008;80(12):2134-40.
- Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nature Reviews Cancer 2007;7:11-22.